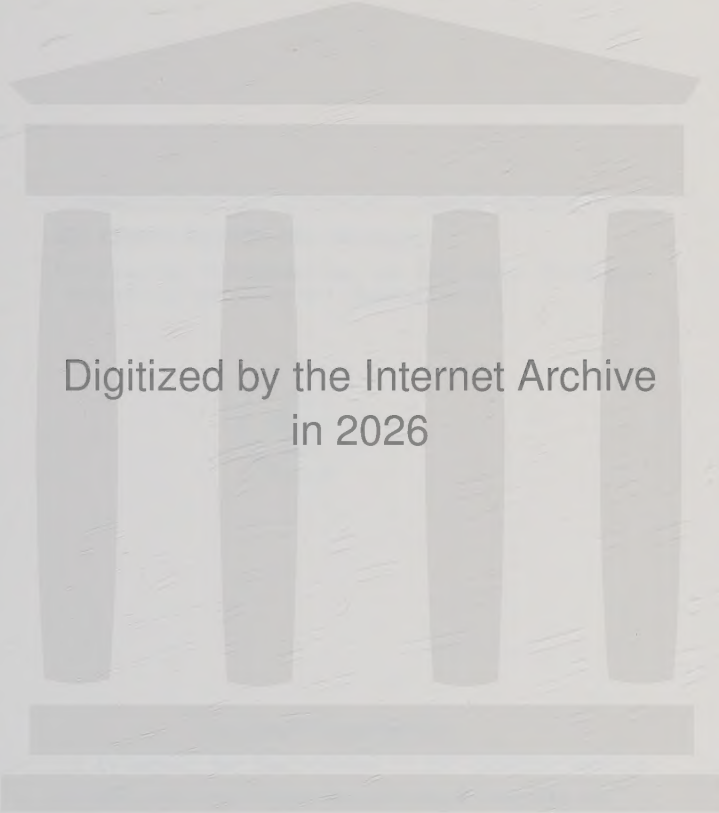


**ZUSAMMENSETZUNG DER FETTSÄUREN
EINIGER PHOSPHOLIPOIDE AUS
LEBERMIKROSOMEN VON KANINCHEN**

(Analyse der Fettsäuren vor und nach
einer 19-tägigen Behandlung der Tiere
mit Phenobarbital)

Wolfgang Maxhofer

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553809_0061

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München

Direktor: Professor Dr. Manfred Kiese

ZUSAMMENSETZUNG DER FETTSÄUREN EINIGER PHOSPHOLIPOIDE
AUS LEBERMIKROSOMEN VON KANINCHEN

(Analyse der Fettsäuren vor und nach einer 19-tägigen
Behandlung der Tiere mit Phenobarbital)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Maxhofer
aus Salzburg
München 1973

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München



Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Lange
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. M. Kiese
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	20. 11. 1973

Meiner Frau U l r i k e

Bei der Einwirkung von bestimmten Pharmaka auf das Endoplasmatische Retikulum der Leberzelle nimmt die Aktivität des strukturgebundenen Enzymsystems zu, welches körperfremde lipidlösliche Stoffe und auch einige körpereigene Verbindungen, wie z.B. Steroidhormone, umbaut. Dieser als "Induktion" bezeichnete Vorgang führt meist unter anderem auch zu einem beschleunigten Umbau der induzierenden Pharmaka (CONNEY 1967).

Struktur und Wirkung dieser Induktoren sind sehr verschieden, jedoch zeichnen sich die meisten durch gute Fettlöslichkeit aus. Langwirkende Arzneimittel, wie z.B. Barbiturate, polychlorierte Kohlenwasserstoffe (z.B. bestimmte Insektizide), vielringige Kohlenwasserstoffe (z.B. Methylcholanthren, Benzpyren), aber auch Verbindungen mit hormonartiger Wirkung (z.B. anabole Steroide) haben induzierenden Effekt (Übersichten bei CONNEY 1967 und SHER 1971).

Die Steigerung der enzymatischen Umbaureaktionen ist durch quantitative Zunahme des aktiven Proteins allein nicht zu erklären: Jüngere Untersuchungen haben auf qualitative Änderungen im Bereich des mikrosomalen Enzymsystems hingewiesen. So wurden z.B. in einzelnen Fällen Änderungen der Michaelis-Konstanten, der optisch gemessenen Substratbindungs-Konstanten, der Bindungsspektren von Äthylisocyanid, der Hemmbarkeit mikrosomaler Oxygenierungsreaktionen und der Affinität der beteiligten Enzyme für Sauerstoff und Kohlenmonoxid beschrieben (ANDERS and MANNERING 1966, LANGE 1966, NETTER 1966, NISHIBAYASHI et al. 1966, SLADEK and MANNERING 1966, GUARINO et al. 1969, KRÖBER et al. 1970).

Eine entscheidende Rolle für die Geschwindigkeit des Ablaufs der Reaktionen im Endoplasmatischen Retikulum spielt wahrscheinlich die Zugänglichkeit des Enzymkomplexes oder auch verschiedener Enzyme für die Substrate (KIESE 1965, GILLETTE 1966, CONNEY 1967, LANGE 1967, CONNEY et al. 1969, HLAVICA und KIESE 1969, HLAVICA et al. 1969, ZIEGLER 1969).

Da die Enzyme des Endoplasmatischen Retikulum strukturgebunden sind, muß das Substrat u.U. Membranen permeieren, die aus Lipid-Protein-Schichten bestehen. Außerdem ist für die Enzym-Substrat-Bindung bzw. - Reaktion eine bestimmte räumliche Anordnung des Enzymproteins notwendig, welche wahrscheinlich durch diese Membranen bzw. durch deren Lipide gegeben bzw. aufrechterhalten wird.

Eine Änderung der Zusammensetzung dieser Membranen könnte ihre Permeabilität sowie die räumliche Anordnung (Tertiärstruktur) der Enzyme und damit die Zugänglichkeit des Enzymsystems ebenso wie die Substratbindung und die Enzym-Substrat-Reaktion beeinflussen.

Die Bedeutung der Phospholipoide für viele enzymatische Reaktionen, auch solche, die im Endoplasmatischen Retikulum ablaufen, steht außer Zweifel (SIEKEVITZ 1959, BRODIE and MAICKEL 1962, FLEISCHER et al. 1962, JURTSCHUK et al. 1963, REMMER und MERKER 1963, KUNTZMAN et al. 1965, TANAKA and STRICKLAND 1965, ROTHFIELD and PEARLMAN 1966, GRAM et al. 1967a, GRAM et al. 1967b, JONES and WAKIL 1967, DUTTERA et al. 1968, LIEN and HANSCH 1968, FOSTER and McWHORTER 1969, LUMPER et al. 1970, SCHULZE und STAUDINGER 1970).

Die Steigerung der mikrosomalen Enzymaktivität geht auch mit einer quantitativen Zunahme der Lipide bzw. Phospholipoide in der Mikrosomenfraktion einher (LANGE und STEUBL 1969, SCHULZE und STAUDINGER 1970, ASSMANN 1971, STEUBL). Ebenso wurden Änderungen des relativen Gehalts einiger Phospholipoidfraktionen durch Induktion

beschrieben (LANGE und STEUBL 1969, ASSMANN 1971, STEUBL).

Ein für die Reaktivität der Phospholipide wesentlicher Bestandteil sind die Fettsäuren, die wahrscheinlich sowohl für die Integrität der Membranstruktur als auch für mögliche Bindungen und Reaktionen mit dem Enzymsystem, vielleicht auch mit dem Substrat, Bedeutung haben. Auf diese Weise könnten sie entscheidend an der enzymatischen Funktion beteiligt sein (ROTHFIELD and PEARLMAN 1966, EBERHAGEN 1968, FINKELSTEIN and CASS 1968, PANDE and MEAD 1968, WEISER and ROTHFIELD 1968, COTMAN et al. 1969, DI AUGUSTINE and FOUTS 1969).

Diese Arbeit sollte der Klärung der Frage dienen, ob sich mit der qualitativen Änderung der enzymatischen Reaktion auch die Fettsäurezusammensetzung der mikrosomalen Phospholipide ändert, und damit einen Beitrag liefern, um die Funktionsweise des Fremdstoff-umbauenden Systems im Endoplasmatischen Retikulum bzw. den Mechanismus des Induktionsprozesses besser erkennen zu können.

2.0. METHODEN

2.1. Reinigung der Glasgeräte

Sämtliche Glaswaren wurden mindestens 24 Stunden in Bichromat-Schwefelsäure eingelegt, dann mehrmals mit Leitungswasser gespült. Die Schlußspülung erfolgte mit entmineralisiertem Wasser, worauf sich Trocknung im Wärmeschrank bei 110°C bei eingeschalteter Umluft anschloß. Filterpapier, Pinzetten, Rührstäbchen, Siedesteinchen und ähnliches wurden mehrmals in Aceton p.a. gewaschen und an der Luft getrocknet.

2.2. Substanzen

Aceton p.a.	(Merck Nr. 14)
Chloroform p.a.	(Merck Nr. 2445)
Diäthyläther p.a.	(Merck Nr. 921)
Eisessig p.a. (99%)	(Merck Nr. 90063)
Methanol p.a.	(Merck Nr. 6009)
Methylacetat zur Synthese (Siedebereich 55-57°C)	(Merck Nr. 9711)
Petroläther p.a. (Kp. 40-60°C)	(Merck Nr. 1775)
Petroläther p.a. (Kp. 50-70°C)	(Riedel de Haen AG Best.Nr. 32209)
Schwefelsäure p.a. (95-97%)	(Merck Nr. 6404)
Trichloressigsäure p.a.	(Merck Nr. 807)
Natriumdithionit (LAB)	(Merck Nr. 6507)
Kaliumcyanid p.a.	(Merck Nr. 4967)
Kaliumjodid p.a.	(Merck Nr. 5043)
Kupfersulfat ($\times 5\text{H}_2\text{O}$) p.a.	(Merck Nr. 2791)
Natriumchlorid (DAB 7)	(Merck Nr. 6400)
Natriumhydrogencarbonat p.a.	(Merck Nr. 6329)
Natriumcarbonat ($\times 1\text{H}_2\text{O}$) (DAB 7)	(Merck Nr. 6386)
Natriumhydroxid p.a.	(Merck Nr. 6495)

Phenobarbitalnatrium (DAB 7) (Merck Nr. 500518)
Seignettesalz (K-Na-tatrat) p.a. (Merck Nr. 8087)
Jod p.a. (Doppelt sublimiert) (Merck Nr. 4761)

Kieselgel zur präp. Dünnschichtchromatographie
Typ D=0 (ohne Binder) (Fa. Camag, MuttENZ,
Schweiz)

Kieselgel für die Säulenchromatographie
(0,05 - 0,2 mm, 70 - 325 mesh ASTM) (Merck Nr. 7734)

2.3. Behandlung der Tiere

Männlichen und weiblichen Kaninchen einer Mischrasse (Durchschnittsgewicht ca. 1900 g) wurde über einen Zeitraum von 19 Tagen täglich 50 mg Phenobarbital-Natrium/Kg Körpergewicht subkutan injiziert. Die Konzentration der Injektionslösung betrug 10 mg Phenobarbital-Natrium/ml isotoner Kochsalzlösung. Eventuell ausgefallenes Phenobarbital wurde durch vorsichtiges Erwärmen wieder in Lösung gebracht.

Die Kontrolltiere erhielten keine Injektionen. Versuchs- und Kontrolltiere wurden mit Altromin-K-Trockenfutter (Herst.: Altrogge Spezialfutterwerk, Lage (Lippe) und Wasser ad libitum ernährt.

2.4. Isolierung der Lebermikrosomen

24 Stunden nach der letzten Phenobarbital-Gabe wurden behandelte und unbehandelte Tiere durch Nackenschlag getötet und nach Durchtrennung der Carotiden ausgeblutet. Anschließend erfolgte Eröffnung des Bauchraumes und Entnahme der Leber. Das Lebergewebe (durchschnittliches Gewicht: ca. 74 g bei unbehandelten und ca. 92 g bei behandelten Tieren) wurde mit ent-

mineralisiertem Wasser gespült und mit einer Schere von Gefäßen und Bindegewebssepten befreit und in Stücke geschnitten.

Um eine Inaktivierung der Enzyme möglichst gering zu halten, war während der Aufarbeitung Kühlung mit Eis und schnelles Arbeiten notwendig. Etwa 35 bis 40 g zerkleinerte Leber wurden durch ein Sieb mit 1,0 mm weiten Löchern gepreßt. Der Preßsaft wurde mit dem 2-fachen Volumen eines eiskalten 0,05 M (isotonen) Tris-HCL-Puffers (pH 7,4) versetzt und homogen gerührt. Die Abtrennung von Zelltrümmern, Zellkernen, Mitochondrien und anderen großen Partikeln erfolgte durch 20 Minuten langes Zentrifugieren mit $9000 \times g$ (Zentrifuge MSE High Speed 18, Temperatur ca. 3°C).

Der $9000 \times g$ - Niederschlag wurde verworfen.

Der $9000 \times g$ - Überstand wurde mit $78000 \times g$ für 60 Minuten erneut zentrifugiert (Zentrifuge Spinco L 2 - 65 K, Beckman Instruments, Temp. ca. $+ 4^{\circ}\text{C}$).

Der Niederschlag wurde in Tris-HCL-Puffer in $3/5$ des Preßsaftvolumens resuspendiert (= sog. Mikrosomenfraktion), im Kühlraum mit einem Magnetrührer homogen gerührt und bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.5.0. Nachweis der Enzyminduktion

Da für die Beurteilung von eventuell während des Induktionsprozesses auftretenden Änderungen gewährleistet sein mußte, daß die angewendeten Dosen des Enzyminduktors Phenobarbital induzierend auf das Endoplasmatische Retikulum gewirkt hatten, wurde die Zunahme des Gehalts der Mikrosomen an Protein, Lipid und Cytochrom P-450 gemessen.

2.5.1. Proteinbestimmung (nach SZARKOWSKA und KLINGENBERG 1963)

Herstellung des Biuret-Reagenzes:

2,25 g Seignettesalz wurden in 100 ml 0,2 N NaOH gelöst, dann 0,75 g Kupfersulfat und 1,25 g Kaliumjodid zugegeben und im Meßkolben mit 0,2 N NaOH auf 250 ml aufgefüllt.

Zur Proteinbestimmung wurden die Mikrosomensuspensionen mit dem zweifachen Volumen isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Jede Proteinbestimmung wurde zweifach angesetzt:

1. Ansatz: 0,05 ml Mikrosomensuspension, 0,5 ml Trichlor-essigsäure, 0,2 ml entmineralisiertes Wasser.
2. Ansatz: 0,1 ml Mikrosomensuspension, 1,0 ml Trichlor-essigsäure, 0,4 ml entmineralisiertes Wasser.

Die beiden Ansätze wurden bei 6000 U/min 10 min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und 2 ml Biuret-Reagenz dazugetroppft. Beim zweiten Ansatz wurde die doppelte Menge Biuret-Reagenz dazugegeben. Beide Ansätze wurden je 30 Minuten geschüttelt, bis kein Bodensatz mehr zu sehen war. Die Extinktion der bei dieser Reaktion gebildeten Farbe wurde bei 546 nm im Zeiss Spektralphotometer PMQ II gemessen. Der Leerwert enthielt aqua dest., Eisessig und Biuret-Reagenz und wurde zunächst gegen Luft gemessen, anschließend die Probe gegen den Leerwert. Danach wurde mit KCN entfärbt und nochmals gemessen. Die Extinktion sollte dabei möglichst klein sein. Die Extinktion nach KCN-Entfärbung wurde von der Extinktion des Meßwerts abgezogen.

Zur Herstellung einer Eichlösung wurde Serumalbumin vom Rind (Behringwerke/Marburg) verwendet. In 1 ml Eichlösung befanden sich 2 mg Protein.

2.5.2. Gravimetrische Bestimmung des Lipidgehaltes aus dem Mikrosomenextrakt s. unter 2.6.1.

2.5.3. Messung des mikrosomalen Cytochrom P-450 (nach OMURA and SATO 1964)

Der Gehalt an mikrosomalem Cytochrom P-450 wurde durch optische Differenzmessungen bestimmt. Die Messungen wurden mit Suspensionen von Mikrosomen aus 0,83 g Leber/ml isotoner NaCl-Lösung entsprechend einem Proteingehalt von 7,5 - 14,0 mg/ml durchgeführt.

Die Lage der Maxima wurde mit einem registrierenden Beckman-Spektralphotometer DK 1 bestimmt, die Extinktion in den Maxima mit einem Beckman-Spektralphotometer DU 2.

Die Mikrosomensuspensionen wurden mit einigen Körnchen Dithionit reduziert und 60 sec lang mit CO gesättigt. Die Extinktion dieser Mikrosomensuspensionen wurde im Vergleich zu Suspensionen von Dithionit-reduzierten Mikrosomen ohne CO gemessen. Die Differenz zwischen der Extinktion im Maximum bei 450 nm und der Extinktion bei 490 nm diente als Maß für den Gehalt an Cytochrom P-450. Dabei entsprach eine Extinktion von 0,091 einem Gehalt von 1 nMol Cytochrom P-450/ml.

2.6.0. Aufarbeitung der Lipide aus Mikrosomensuspensionen

2.6.1. Extraktion der Gesamtlipide aus isolierten Mikrosomen

Zur Extraktion der Lipide wurden für jede Versuchsreihe bis zu 13 ml Mikrosomensuspension mit dem 20-fachen Volumen eines Gemisches von Chloroform und Methanol (2:1, V:V) versetzt. Die Mikrosomensuspension wurde dem Lösungsmittelgemisch tropfenweise unter ständigem Rühren oder Schütteln des Extraktionsmittels zugefügt, um eine gleichmäßige und lockere Ausflockung des Proteins zu erreichen. Dieses Vorgehen sollte die Bildung dicker Proteinkoagula verhindern, aus denen das Lipid nicht oder nur unvollständig zu extrahieren gewesen wäre.

Die Mischung aus Extraktionsmittel und Mikrosomen wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen und nach Ablauf dieser Zeit durch ein fettfreies Filter gegossen, um den flockigen Bodensatz abzutrennen. Das Filtrat wurde mit 20 Vol% entmineralisiertem Wasser versetzt und ausgeschüttelt, um den Gehalt an hydrophilen Substanzen zu vermindern. Dabei entstanden zwei Phasen (obere Phase: Chloroform:Methanol:Wasser = 3:48:47, V:V:V; untere Phase: Chloroform:Methanol:Wasser = 86:14:1, V:V:V, vgl. FOLCH et al. 1957).

Die obere Phase wurde mit Hilfe einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Glasdüse abgesaugt, sodaß möglichst keine Schlieren auf der Oberfläche der lipidhaltigen Unterphase zurückblieben. Die Unterphase wurde in einem Rotationsverdampfer (Rotavapor R, Fa. Büchi, Schweiz) unter stetigem Stickstoffstrom (zwischengeschalteter Blasenähler, 60 - 120 Blasen/min) unter Wasserstrahlpumpenvakuum bei max. 60°C zur Trockne eingeengt. Der Ausschluß von Sauerstoff bei der Einengung war notwendig, um oxydative Veränderungen der Fettsäuren zu vermeiden. Zur Endeindampfung wurden spitzzulaufende Zentrifugengläschen mit Schliff (EBERHAGEN 1965) verwendet, deren Gewicht zuvor nach Trocknen im Exsikkator bestimmt worden war. Dieses Gewicht wurde vom Bruttogewicht des Zentrifugengläschens mit dem eingeengten Lipidextrakt, das ebenfalls nach Trocknen im Exsikkator gewonnen worden war, abgezogen, um das Gewicht der extrahierten Lipide zu erhalten.

Die Lipide, die einen gelbgläsernen Niederschlag auf den Glaswänden bildeten, wurden so in einem abgemessenen Volumen Petroläther (Kp. 50 - 70°C) aufgelöst, daß eine Konzentration von 10 mg Gesamtlipid/ml Petroläther entstand.

Das Gemisch enthielt eine Vielzahl von Lipiden: Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylinosit (PI),

Phosphatidylserin (PS), Phosphatidyläthanolamin (PÄ), Lysophosphatidylcholin (LPC), Sphingomyelin (Sph), Lysophosphatidyläthanolamin (LPÄ), Cardiolipin (CL) und andere polare Phospholipide, Di- und Triglyceride sowie freie Fettsäuren (FFS), Ester freier Fettsäuren, Cholesterin (Ch) und Ester des Cholesterins (CE).

Die petrolätherischen Lipidlösungen wurden unter Stickstoff bei + 4°C und Lichtabschluß bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.6.2. Gewinnung von PC, PI, PS und PÄ aus dem Gesamtlipidgemisch

Zur Isolierung der einzelnen Phospholipoid-Fractionen aus dem Gesamtlipidgemisch diente die präparative Dünnschichtchromatographie.

Eine abgewogene Menge Kieselgel wurde in einem bestimmten Volumen 1 mM Natriumcarbonat-Lösung aufgeschwemmt und mit einem Beschichtungsgerät (Desaga, Heidelberg) auf acetongereinigte Glasplatten (20x20 cm) aufgetragen. Die Schichtdicke betrug 0,5 mm. Dem Aufstreichen folgte Lufttrocknung der beschichteten Platten bei Raumtemperatur über etwa zwölf Stunden. Anschließend wurden die Platten in ein Chromatographiegefäß eingestellt, das 1 cm hoch mit Aceton gefüllt war. Die Laufgefäße (Desaga, Heidelberg) hatten seitliche Glasriffelung, die eine gleichzeitige Chromatographie von fünf Platten in Vertikalstellung erlaubten.

Dieser Vorlauf mit Aceton diente der nochmaligen Reinigung und sollte eine eventuell während der Beschichtung aufgetretene Verunreinigung von Platten und Gel mit Lipiden beseitigen.

Sobald die Lösungsmittelfront den oberen Rand der Platten erreicht hatte, wurden diese aus dem Chromatographiegefäß entnommen und für einige Minuten der Raumluft zur Trocknung ausgesetzt. Der Lufttrocknung folgte eine Aktivierung

der Kieselgelschicht im Trockenschrank (Umluft, ca 110°C, 60 min). Nach Abkühlen der Platten im Exsikkator auf ca. 40°C wurden in einer Entfernung von 3 cm vom unteren Rand der Platte sechs etwa 2 cm lange Striche parallel zur Grundkante aufgetragen. Das Auftragen erfolgte mit Enzympipetten (0,2 ml Volumen). Pro Strich wurde 0,1 ml aufgetragen, das entspricht 1 mg Lipidgemisch.

Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Chloroform:Methanol:Eisessig:Wasser = 25:15:4:2 (V:V:V:V) verwendet, wie es SKIPSKI et al. (1964) zur Trennung von Phospholipoiden aus Lipidgemischen angegeben haben.

Das Gemisch wurde vor jedem Chromatographievorgang frisch hergestellt, da länger stehende Gemische die Lipide in der Dünnschichtchromatographie schlechter trennten. Das Laufmittel wurde bis auf eine Höhe von ca. 1,5 cm in eine trockene Chromatographiekammer eingefüllt, in der sich ein gereinigtes Filterpapier befand, das Boden, vordere und hintere Wand bedeckte. Das Lösungsmittel stieg im Filterpapier bis zum oberen Gefäßrand und benetzte auf diese Weise eine große Fläche. Dies trug zu einer beschleunigten und gleichmäßigen Sättigung der Kammer während des folgenden Chromatographievorgangs bei.

Einige Stunden nach dieser Vorbereitung wurden je zwei bis drei präparierte Platten vorsichtig, aber schnell in eine Kammer gestellt, um die Sättigung der Kammer nicht allzusehr zu beeinträchtigen. Die Schichtseite der außen stehenden Chromatographieplatten zeigte nach innen. Bei gleichzeitiger Chromatographie von mehr als drei Platten pro Kammer beobachteten wir stets starke Abweichungen in der Lösungsmittelfront auf den mittleren Platten.

Sämtliche Chromatographievorgänge erfolgten in einem Chromatographieraum, dessen Temperatur zwischen 20 und 24°C lag. Nach einer durchschnittlichen Laufzeit von 140 Minuten wurden die Platten den Kammern entnommen

und für ca. 5 bis 10 Minuten der Lufttrocknung ausgesetzt. Anschließend erfolgte sofortige Verbringung in eine weitere Chromatographiekammer, auf deren Boden sich etwa 10 g doppelt sublimiertes Jod befanden. Die Platten wurden so lange dem Joddampf ausgesetzt, bis auch die in geringerer Menge vorliegenden Phospholipoid-Fractionen (z.B. PI, PS, Sph, LPC) gerade an einer Gelbfärbung erkennbar waren. Danach wurden die Platten diesem Gefäß entnommen und die gelben Flecke mit fettfreier Nadel zur Markierung umstichelt. Da das Jod wieder von den Platten verdampfte, war die Gelbfärbung nach ca. 10 bis 15 Minuten mit dem Auge nicht mehr zu erkennen.

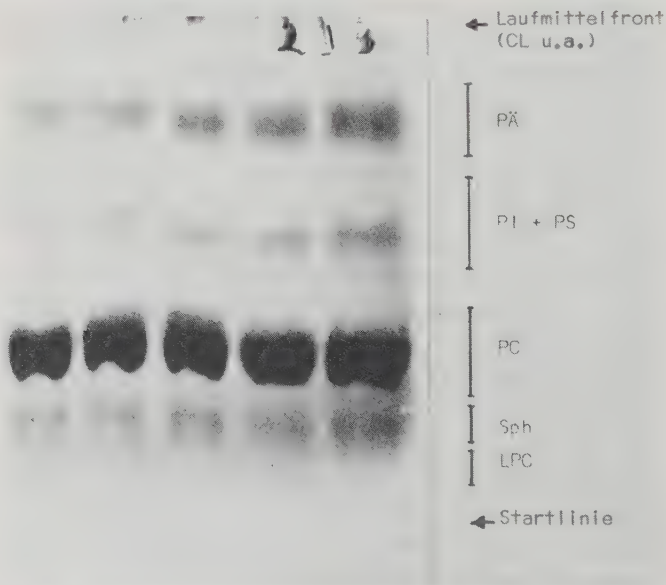


Abb. 1: Dünnschichtchromatographie von mikrosomalen Phospholipoiden.
Anfärbung der Phospholipoidflecken im Joddampf nach dünn-
schichtchromatographischer Trennung mit der Methode von
SKIPSKI et al. (1964).
Einzelheiten der Methode s. 2.6.2.

Für die Analyse der Fettsäuren (FS) wurden folgende Fraktionen ausgewählt: PÄ, PC, PI und PS. Die Fettsäuren von PI und PS wurden gemeinsam analysiert, da diese beiden Fraktionen meist nicht genügend getrennt waren. Die umstichelten phospholipoidhaltigen Flecke im Kieselgel wurden mit einem Metallspatel vorsichtig abgenommen und fraktionsweise in ein 20 ml fassendes Zentrifugenglas zusammen mit 10 ml Chloroform/Methanol (2:1, V:V) gebracht. Zur Elution der Lipide waren die Gläser mit Aluminiumfolie abgedeckt und wurden 3 min in einem elektrischen Wirbler (Whirlmix, Cenco) aufgeschüttelt. Nach dem Eluieren folgte ein Abzentrifugieren des Kieselgels in einer Zentrifuge (Typ UJ 2, Fa. Martin Christ, Osterode, Harz) mit 6000 U/min über 20 min. Der phospholipoidhaltige Überstand wurde vorsichtig in ein Zentrifugengläschen mit Schliff und rundem Boden (EBERHAGEN 1965) dekantiert und der kompakte Kieselgelbodensatz verworfen. Das Eindampfen des dekantierten Überstands erfolgte wie bei der Gewinnung der Gesamtlipide (vgl. 2.6.1.).

2.6.3. Umesterung der Phospholipide und Gewinnung der Fettsäuremethylester (FME)

Die Umesterung der aus dem Kieselgel eluierten Phospholipide erfolgte nach dem von EBERHAGEN (1965) angegebenen Mikroverfahren: 1-stündiges Kochen im Rückfluß bei 55°C von max. 20 mg Phospholipoid mit 2 ml 5%iger methanol. Salzsäure und 2 ml Methylacetat, nach dem Erkalten Zusatz von 1 ml entmineralisiertem Wasser und 1,5 ml eines Gemisches von Äther und Petroläther (Kp. 40 - 60°C) (1:1, V:V), 3-minütiges Rühren mit einem Magnetrührer unter Stickstoff, Absaugen der oberen Phase mit einer speziellen Lösungsmittelpipette, zweimalige Wiederholung der Extraktion der Unterphase mit 1,5 ml eines Gemisches

von Äther und Petroläther (wie oben), Vereinigung der drei Oberphasen, Zusatz von 1 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung zum Abpuffern, 3-minütiges Rühren mit einem Magnetrührer, Absaugen der organischen Oberphase mit spezieller Lösungsmittelpipette, Überführung in ein Zentrifugengläschen mit spitzem Boden und Schliff, Abdampfen des Lösungsmittels wie unter 2.6.1., jedoch bei 35 - 40°C Wasserbad-Temperatur.

2.6.4. Reinigung der Fettsäuremethylester

Die Reinigung der FME von Begleitstoffen wie Cholesterin, Kohlenwasserstoffen und ähnlichen unverseifbaren Verbindungen erfolgte durch Säulenchromatographie (EBERHAGEN 1965) mit Glassäulen von 20 bis 25 cm Länge und 1 cm Durchmesser mit Porzellanfritte, gefüllt mit einer Aufschlammung von 5,5 bis 6,0 g Kieselgel (zur Säulenchromatographie) in Petroläther (Kp. 50 - 70°C). Auftragen des Verdampfungsrückstandes von 2.6.3., gelöst in 1,5 ml Petroläther (Kp. 40 - 60°C), Eluieren der FME mit ca 45 ml einer 2%igen Lösung von Diäthyläther in Petroläther (Kp. 50 - 70°C), Einengen des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer (s. 2.6.1.) bei einer Wasserbad-Temperatur von max. 35°C auf ca. 7 ml und Aufbewahrung in lichtgeschützten Zentrifugenröhrchen mit Schliff unter Stickstoff bei ca. - 20°C.

2.6.5. Gaschromatographische Analyse der Fettsäuremethylester

Die gaschromatographische Analyse der FME-Gemische erfolgte in einem Gerät der Fa. Hewlett-Packard (Research Gas Chromatograph, Serie 5770 B).
Trennsäule: Stainless Steel, 6 feet, 1/8 inch
Füllung: 6% Diäthylenglykol-Succinat auf Chromosorb W

Trärgas	: Stickstoff, Durchflußgeschwindigkeit 30 ml/min
Flammdetektor	: Wasserstoff, Durchflußgeschwindigkeit 25 ml/min
	Synth. Luft, Durchflußgeschwindigkeit 180 ml/min
Temperatur am Injection Port	: 252 - 288°C
Temperatur am Flammdetektor	: 268 - 290°C
Programmablauf	: 128 - 300°C
Rate der Temperatursteigerung	: 1°C/min
Verstärkung	: $10^3 \times 8$ bis $10^2 \times 4$

Die FME-Gemische wurden in einem Volumen von 2 bis 5 μ l in den Injection Port eingespritzt.

Zur Identifizierung der einzelnen Peaks diente der Retentionszeitenvergleich mit einem Gemisch von FME bekannter Zusammensetzung (Qualitat. FME-Testmischungen L 203, L 205, L 207, Applied Science Laboratories, State College, Pennsylvania), das am selben Tag unter denselben Bedingungen getrennt wurde.

Zur quantitativen Bestimmung der getrennten FME wurden die Flächen unter den Peaks mit einem Polar-Planimeter (OTT-Planimeter, Typ 30 L) gemessen, summiert und die relativen Mengen der einzelnen FME in % der Summe errechnet.

3.0. ERGEBNISSE

3.1. Nachweis der Enzyminduktion durch Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital

3.1.1. Der Gehalt isolierter Kaninchenlebermikrosomen an Cytochrom P-450 nahm nach 19-tägiger Behandlung der Tiere mit 50 mg Phenobarbital-Natrium/kg Körpergewicht/Tag (s. 2.3.) um 120% zu (Tab. 1).

Tab. 1: Zunahme des Gehalts isolierter Kaninchenlebermikrosomen an Cytochrom P-450 nach Behandlung der Tiere mit Phenobarbital-Natrium

Behandl. der Tiere	Anzahl der Tiere	Cytochrom P-450 ¹⁾ (nMol/mg Protein/ml)	Änder. in %	p
keine Behandl.	9	1,68 ± 0,24	+ 120	< 0,0005
19 Tage Phenobarb.-Natrium (s. 2.3.)	26	3,70 ± 0,19		

1) Mittelwerte ± mittl. Fehler des Mittelwertes

p = Irrtumswahrscheinlichkeit für den Unterschied der Werte von behandelten und unbehandelten Tieren

3.1.2. Das relative Lebergewicht (g Leber/kg Körpergewicht) nahm nach 19-tägiger Behandlung der Tiere mit 50 mg Phenobarbital-Natrium/kg Körpergewicht/Tag (s. 2.3.) um 17% zu (Tab. 2).

Tab. 2: Zunahme des relativen Lebergewichtes bei Kaninchen
nach Behandlung der Tiere mit Phenobarbital-Natrium

Behandl. der Tiere	Anzahl der Tiere	Relat. Lebergew. ¹⁾ (g Leber/kg KG)	Änder. in %	p
keine Behandl.	17	40,34 $\pm$ 2,44	+ 17	< 0,025
19 Tage Phenobarb.- Natrium (s. 2.3.)	11	47,24 $\pm$ 1,35		

1) Mittelwerte $\pm$ mittl. Fehler des Mittelwertes

p = Irrtumswahrscheinlichkeit für den Unterschied der Werte von behandelten und unbehandelten Tieren.

KG = Körpergewicht

3.1.3. Tabelle 3 zeigt die Zunahme des Gehalts an Protein von Mikrosomen behandelter Tiere (s. 2.3.) gegenüber dem Proteingehalt von Mikrosomen unbehandelter Tiere. Die Steigerung betrug 72% (Tab. 3).

Tab. 3: Zunahme des Gehalts isolierter Kaninchenlebermikrosomen an Protein nach Behandlung der Tiere mit Phenobarbital-Natrium

Behandl. der Tiere	Anzahl der Tiere	Proteingehalt ¹⁾ (mg Protein/ml Mikr.susp.)	Änder. in %	p
keine Be- handl.	5	20,78 $\pm$ 1,23	+ 72	< 0,0005
19 Tage Phenobarb.- Natrium (s. 2.3.)	6	35,70 $\pm$ 1,04		

1) Mittelwerte $\pm$ mittl. Fehler des Mittelwertes

p = Irrtumswahrscheinlichkeit für den Unterschied der Werte
von behandelten und unbehandelten Tieren

- 3.1.4. Der Gehalt an Gesamtlipiden von isolierten Kaninchenlebermikrosomen nahm unter derselben Behandlung (s. 2.3.) gegenüber dem Gesamtlipidgehalt von Mikrosomen unbehandelter Tiere um 173% zu (s. Tab. 4).

Tab. 4: Zunahme des Gehalts isolierter Kaninchenlebermikrosomen an Gesamtlipiden nach Behandlung der Tiere mit Phenobarbital-Natrium

Behandl. der Tiere	Anzahl der Tiere	Gesamtlipid- ¹⁾ gehalt(mgLipid/ ml Mikr.susp.)	Änder. in %	p
keine Be- handl.	16	7,85 $\pm$ 0,61	+ 173	< 0,0005
19 Tage Phenobarb.- Natrium (s. 2.3.)	11	21,48 $\pm$ 2,08		

1) Mittelwerte $\pm$ mittl. Fehler des Mittelwertes

p = Irrtumswahrscheinlichkeit für den Unterschied der Werte von behandelten und unbehandelten Tieren

3.2. Die Zusammensetzung der Fettsäuren einiger Phospholipoide aus isolierten Kaninchenlebermikrosomen ist aus Tab. 5 ersichtlich. Nach Behandlung der Versuchstiere mit Phenobarbital-Natrium (s. 2.3.) über einen Zeitraum von 19 Tagen ließen sich einige signifikante Änderungen im Fettsäuremuster feststellen.

Tab. 5: Zusammensetzung der Fettsäuren einiger Phospholipide aus isolierten Lebermikrosomen von unbehandelten und Phenobarbital-behandelten Kaninchen

Behandlung der Tiere	keine	Phenobarbital	keine	Phenobarbital	keine	Phenobarbital
Phospholipoid ¹⁾	PC	PC	PÄ	PÄ	PI + PS	PI + PS
Fettsäuren ²⁾						
16:0	45 ⁺ 4,00(8)	38 ⁺ 2,79(7)	31 ⁺ 3,35(7)	36 ⁺ 5,64(6)	37 ⁺ 7,14(8)	21 ⁺ 1,08(5) ⁴⁾
16:1	0,2 ⁺ 0,21(8)	0,3 ⁺ 0,30(7)	0 (7)	0 (6)	0,7 ⁺ 0,48(8)	0 (5)
17:0, 17:1	0,5 ⁺ 0,19(8)	0,3 ⁺ 0,22(7)	2 ⁺ 0,41(7)	1 ⁺ 0,30(6)	0,6 ⁺ 0,31(8)	0,8 ⁺ 0,37(5)
18:0	22 ⁺ 2,13(8)	23 ⁺ 2,28(7)	36 ⁺ 2,03(7)	30 ⁺ 2,80(6) ⁴⁾	35 ⁺ 4,07(8)	39 ⁺ 4,01(5)
18:1	12 ⁺ 1,73(8)	12 ⁺ 0,81(7)	13 ⁺ 1,69(7)	12 ⁺ 1,40(6)	11 ⁺ 2,54(8)	16 ⁺ 1,83(5)
18:2	18 ⁺ 2,42(8)	25 ⁺ 2,54(7) ³⁾	17 ⁺ 2,87(7)	20 ⁺ 2,25(6)	13 ⁺ 3,02(8)	22 ⁺ 2,88(5) ³⁾
20:0	2 ⁺ 0,87(8)	1 ⁺ 0,63(7)	2 ⁺ 0,50(7)	1 ⁺ 0,32(6)	2 ⁺ 0,43(8)	2 ⁺ 0,46(5)

- 1) Erläuterung der Abkürzung s. 2.6.1. (S.9f)
 - 2) Erläuterung der Abkürzungen s. Legende zu Abb. 2 (S. 16)
 - 3) p < 0,05
 - 4) p < 0,10
- p = Irrtumswahrscheinlichkeit für den Unterschied der Werte von behandelten und unbehandelten Tieren.

Die Zahlen sind Mittelwerte ⁺ mittl. Fehler des Mittelwertes der relativen Fettsäuremengen in % der Gesamtmenge. Die Zahlen in Klammern bedeuten Anzahl der analysierten Mikrosomenpräparate (s. 2.4.) von verschiedenen Versuchstieren.

Wie Tabelle 5 zeigt, war die Zusammensetzung der einzelnen Fettsäuren in den untersuchten Phospholipoiden aus Lebermikrosomen von Kaninchen nahezu identisch. Nach Behandlung der Tiere mit Phenobarbital (s. 2.3.) traten folgende Änderungen ein: Linolsäure (18:2) nahm in PC von 18 auf 25% und in PI + PS von 13 auf 22% zu ($p < 0,05$). Die Abnahme der Palmitinsäure (16:0) in PI + PS von 37 auf 21% und die Abnahme von Stearinsäure (18:0) in PÄ von 36 auf 30% konnten nicht mit genügender Wahrscheinlichkeit statistisch gesichert werden ($p < 0,10$).

19-tägige Behandlung von Kaninchen mit dem Enzyminduktor Phenobarbital bewirkte Zunahme des relativen Lebergewichtes der Versuchstiere sowie Anstieg des Gehalts der Mikrosomen an Cytochrom P-450, an Protein und an Lipiden. Die Zunahme des Gehalts an Cytochrom P-450 auf mehr als das Doppelte und die Zunahme an Mikrosomenprotein spricht dafür, daß die Behandlung zu einer Induktion des Endoplasmatischen Retikulum führte, welche mit den in vorangehenden Arbeiten beschriebenen Effekten (z.B. KRATZ und STAUDINGER 1967, ASSMANN 1971, STEUBL, MALSY-MINK) und auch mit den Ergebnissen, welche andere Autoren bei Behandlung von Ratten erhielten (z.B. SCHULZE und STAUDINGER 1970), vergleichbar ist.

Das relative Lebergewicht (g Leber/kg KG) nahm um durchschnittlich 17% bei der Behandlung der Tiere zu. Das entspricht den Angaben von LANGE (1968) für gleichartig behandelte Tiere.

Die Vermehrung des Gehalts der Mikrosomen an Protein betrug 72%. Diese Zunahme ist nahezu so groß bzw. größer als die Zunahme in entsprechenden Untersuchungen von LANGE (1968), ASSMANN (1971) und STEUBL und größer als in Untersuchungen mit kürzer dauernder Phenobarbitalbehandlung bei Ratten (SCHULZE und STAUDINGER 1970).

Entsprechendes gilt für die Zunahme des Gehalts an mikrosomalen Lipiden: Die in dieser Arbeit gemessene Vermehrung an Gesamtlipiden war deutlich größer als in den Untersuchungen von LANGE (1968), etwas größer als in den Versuchen von ASSMANN (1971) und nahezu so groß wie in den Untersuchungen von STEUBL. Die Vermehrung an Gesamtlipiden war jedoch bedeutend größer als in den Versuchen mit kürzer dauernder Phenobarbitalbehandlung an Ratten (SCHULZE und STAUDINGER 1970).

Die Fettsäuremuster der einzelnen in dieser Arbeit untersuchten Phospholipide waren nicht wesentlich verschieden voneinander. Auffällig war lediglich ein relativ höherer Gehalt an Palmitinsäure und ein relativ niedrigerer Gehalt an Stearinsäure in der PC-Fraktion.

Veröffentlichungen anderer Laboratorien über die Fettsäurezusammensetzung in Phospholipiden aus Lebermikrosomen von Kaninchen liegen nicht zum Vergleich vor, jedoch gaben KEENAN und MORRÉ (1970) für raue Membranen des Endoplasmatischen Retikulum aus Rattenleberzellen ganz ähnliche Werte an.

Die Behandlung der Tiere mit dem Enzyminduktor Phenobarbital verursachte eine statistisch gesicherte Zunahme von Linolsäure (18:2) in PC und PI + PS. Außerdem nahm der Gehalt an Palmitinsäure (16:0) in PI + PS und an Stearinsäure (18:0) in PÄ ab; diese Abnahme konnte aber nicht mit genügender Wahrscheinlichkeit statistisch gesichert werden. Alle diese Änderungen ließen sich nicht zu den früher beobachteten qualitativen Änderungen optischer und kinetischer Daten von mikrosomalen Enzymen in Beziehung setzen.

Ein ähnliches Ergebnis erhielten ELLINGSON et al. (1970): Diese Untersucher injizierten Ratten intraperitoneal vier Tage lang Phenobarbital, allerdings in einer sehr viel niedrigeren Dosis, nämlich 4,0 mg/kg/Tag; die Kontrolltiere erhielten isotone Kochsalzlösung. Es traten keine signifikanten Änderungen im Fettsäuremuster der mikrosomalen Phospholipide auf.

ELLINGSON et al. fanden jedoch nach dieser Behandlung Änderungen von Enzymaktivitäten: So nahm die spezifische Aktivität der mikrosomalen Glucose-6-Phosphatase etwa auf die Hälfte ab, die der N-Demethylierung von Äthylmorphin auf das Doppelte zu.

Diese Aktivitätsänderungen können demnach ebenso wie die Änderungen der Enzymaktivitäten im vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (LANGE 1967, LANGE und THUN 1969, KRÜBER et al. 1970, ASSMANN 1971, STEUBL, MALSKY-MINK) nicht auf Änderungen im Gehalt an Fettsäuren in den einzelnen Phospholipoid-Fractionen zurückgeführt werden.

Zu bedenken ist jedoch, daß die einzelnen Phospholipide komplexe Lipide sind, das heißt Gemische aus mehreren molekularen Spezies. Glycerophospholipide zum Beispiel kommen - je nach Verbindung der Kohlenwasserstoffketten zum Glycerin - in vier Formen vor (Diacyl-, Plasmalogen-, Monoalkoxy- und Dialkoxy-Form), die sich säulenchromatographisch trennen lassen. Innerhalb jeder Lipoidgruppe wiederum gibt es verschiedene molekulare Spezies, die in der Länge der Kohlenstoffketten und Zahl der Doppelbindungen differieren und sich säulenchromatographisch nicht trennen lassen und infolgedessen bei der verwendeten Methode auch nicht getrennt wurden.

Denkbar wäre, daß in einer Phospholipoid-Unterfraktion eine bestimmte Fettsäure zugunsten einer anderen abnimmt, dafür aber in einer anderen Phospholipoid-Unterfraktion zu Lasten der anderen Fettsäure zunimmt, sodaß in der Gesamtbilanz keine Veränderung erkennbar ist. Das bedeutet, daß feinere Unterschiede in der Zusammensetzung - auch wenn sie die Struktur der Lipoidmembranen verändern - mit diesen Methoden vielleicht nicht erfaßt werden können.

Außerdem wäre es möglich, daß während des Induktionsprozesses die Menge der einzelnen Fettsäuren zwar etwa gleich blieb, jedoch ihre Stellung innerhalb der Phospholipide verändert war, d.h. daß beim Wechsel der Fettsäuren während der Phenobarbitalbehandlung andere Positionen bevorzugt wurden als bei nicht behandelten Tieren. Dabei könnte entweder die Aktivität der einzelnen Acyltransferasen verschieden

stark zugenommen haben oder aber ihre Positionsspezifität verändert worden sein (ELLINGSON et al. 1970), analog der Änderung der Stereospezifität von mikrosomalen Enzymen unter der Behandlung von Tieren mit Phenobarbital (McMAHON et al. 1969).

Obwohl unter der Phenobarbitalbehandlung keine umfassende Änderung des Fettsäuremusters der untersuchten Phospholipide auftrat, ließ sich doch eine statistisch signifikante Änderung einer Fettsäure nachweisen: Die zweifach ungesättigte Linolsäure (18:2) nahm in PC von 18% auf 25% ($p < 0,05$) und in PI + PS von 13% auf 22% zu ($p < 0,05$). Eine statistisch nicht gesicherte, mit 90% Wahrscheinlichkeit belegte Änderung ließ sich in PI + PS an Palmitinsäure (16:0) erkennen, die von 37% auf 21% abnahm ($p < 0,10$). Weiterhin zeigte sich in PÄ eine Abnahme der Stearinsäure (18:0) von 36% auf 30% ($p < 0,10$).

Ein ähnliches Ergebnis erhielt C.G. ROGERS (1971) bei Behandlung von Ratten mit Phenothiazinderivaten. Vier Stunden nach einer einmaligen Injektion von 50 mg Chlorpromazin/kg i.p. wurde in den gesamten mikrosomalen Lipoiden eine signifikante Zunahme von Linolsäure (18:2) von 18% auf 22% gefunden.

Eine derartige Verschiebung im Fettsäuremuster (Abnahme von gesättigten Fettsäuren und Zunahme ungesättigter Fettsäuren) wurde auch bei ganz anderen Veränderungen im Lebergewebe gefunden: VEERKAMP et al. (1961) fanden in primären Leberkarzinomen der Ratte einen geringeren Gehalt der Stearinsäure (18:0) und einen wesentlich höheren Gehalt an Ölsäure (18:1) als im Lebergewebe gesunder Kontrolltiere.

Einen ähnlichen Befund erhoben THEISE und BIELKA (1968): Diese Autoren beschrieben eine ausgeprägte Erhöhung des Gehalts an Ölsäure (18:1) und Linolsäure (18:2) in den gesamten mikrosomalen Phospholipoiden aus Karzinomen der Ratte gegenüber den Phospholipoiden aus gesundem Gewebe.

EBERHAGEN et al. (1968) beschrieben einen auf das Mehrfache ansteigenden Gehalt an Phospholipoid-Arachidonsäure (22:4) in der Nebenniere von Ratten nach i.p. Injektion von Formalin, nach Gaben von ACTH und nach letaler Röntgenbestrahlung. Alle diese Autoren diskutieren eine Veränderung der Lipoproteidstruktur bzw. eine veränderte Bindung der Phospholipide innerhalb von Membranen durch die angegebenen Verschiebungen im Fettsäuremuster und bringen sie mit einer erhöhten Aktivität der untersuchten Gewebe in Beziehung.

Analog zu dieser Annahme könnte eine gleichartige Verschiebung im Muster der Fettsäuren mikrosomaler Lipide (Abnahme von gesättigter Säure und Zunahme von ungesättigter Säure) vielleicht mit einer Veränderung der Permeabilität der mikrosomalen Membranen, z.B. im Sinne einer vermehrten Durchlässigkeit, verbunden sein. Dies wäre wahrscheinlich von erheblicher Bedeutung für den Ablauf mikrosomaler enzymatischer Prozesse. So könnte sich z.B. die Zugänglichkeit der Hydroxylierenden Enzyme für ihre Substrate erhöhen, ebenso könnten Cofaktoren, aber auch Hemmstoffe leichter passieren bzw. Endprodukte schneller abtransportiert werden.

Die Zahl der Doppelbindungen in den Lipoidfettsäuren scheint eine Beziehung zu bestimmten Membraneigenschaften zu haben (O'BRIEN 1965, COTMAN et al. 1969, MANZOLI et al. 1970), aber auch zu bestimmten enzymatischen Prozessen: So fanden verschiedene Autoren eine Abhängigkeit enzymatischer Umsetzungen vom Sättigungsgrad der Phospholipoidfettsäuren.

ROTHFIELD and PEARLMAN (1966) und WEISER and ROTHFIELD (1968) zeigten an Extrakten von *Salmonella typhi* murium, daß die enzymatische Bindung von Galaktosemolekülen an ein Akzeptor-Lipopolysaccharid nur bei Anwesenheit von bestimmten Phospholipoiden ablief, die ungesättigte Fettsäuren oder aber Fettsäuren mit Zyklopropanrest enthielten. Eine definierte Aktion der Doppelbindung,

z.B. im Sinne einer Änderung der Elektronenkonfiguration, konnte durch die äquivalente Wirksamkeit der Fettsäuren mit zyklischen Resten ausgeschlossen werden. Phospholipide mit Zyklopropanfettsäuren und mehrfach ungesättigten Fettsäuren zeigten jedoch annähernd gleiche Lösungseigenschaften in polaren Lösungsmitteln und Methanol, sogenannte "micellare Dispersion", während mit Phospholipiden, die gesättigte Fettsäuren enthielten, ein solcher Lösungszustand nicht erzeugt werden konnte. Diese Phospholipide waren auch nicht methanollöslich. Die Autoren sehen eine Erklärung für die angegebene Aktivitätsbeeinflussung in der Fähigkeit der ungesättigten und Zyklopropan-Fettsäuren, derartige "Micellen" bzw. "flüssige Kristalle" zu bilden, sobald sie einem polaren Reaktionspartner ausgesetzt werden.

BENEDETTI und EMMELLOT (1968) fanden bei elektronenoptischen Untersuchungen, daß Phospholipide mit hohem Anteil an ungesättigten Fettsäuren ausgedehnte Filme bildeten, während Phospholipide mit vorwiegend gesättigten Fettsäuren dicht gepackt erschienen.

FINKELSTEIN und CASS (1968) berichteten, daß die Wasserpermeabilität artefizieller Membranen, bestehend aus PC mit gesättigten Fettsäuren, bedeutend niedriger war als die Permeabilität entsprechender Membranen mit hohem Anteil an ungesättigten Fettsäuren.

KEENAN und MORRÉ (1970) haben den Gehalt an Fettsäuren und Cholesterin aus Rattenleber gemessen und kamen zu entsprechenden Schlüssen. Plasmamembranen hatten in diesen Untersuchungen den höchsten Anteil an gesättigten Fettsäuren und Cholesterin, während die Membranen des Endoplasmatischen Retikulum signifikant mehr ungesättigte Fettsäuren und weniger Cholesterin besaßen. Das aus Golgi-Apparat gewonnene Membranmaterial nahm eine Mittelstellung ein. Diese deutliche Abstufung in der Lipidzusammensetzung der einzelnen Organellen entspricht

nach Ansicht der Autoren einer von Plasmamembran über Golgi-Apparat bis zum Endoplasmatischen Retikulum zunehmenden Permeabilität und einer entsprechend abgestuften Beteiligung am biochemischen Geschehen der Zelle.

Eine genauere Kenntnis über die Art der Beteiligung dieser Fettsäuren an der Struktur und an den Funktionen der Membranen fehlt jedoch noch. Die Fettsäurekette könnte z.B. mit bestimmten hydrophoben Aminosäure-Gruppen aus Membranproteinen reagieren und dadurch zur Aufrechterhaltung bzw. zu Änderungen der Struktur beitragen (COTMAN et al. 1969, KORN 1969). Freie Fettsäuren könnten andere Stoffe aus ihrer Proteinbindung verdrängen (BOYER et al. 1947, SOLOMON et al. 1968), indem sie selbst mit der vorher besetzten Proteingruppe reagieren. Gebundene oder freie Fettsäuren könnten schließlich auch in den Ablauf enzymatischer Vorgänge mit einbezogen sein.

Trotz dieses Mangels an Kenntnis über die chemische und physikalische Bedeutung der Fettsäuren in Membranlipoiden sprechen viele der zitierten Ergebnisse dafür, daß sie eine wichtige Rolle für Membranaufbau und Membranfunktion spielen. Allerdings war es bisher - auch in der vorliegenden Arbeit - nicht möglich, einen Zusammenhang zwischen den quantitativen und qualitativen enzymatischen Änderungen, die während des Induktionsprozesses im Endoplasmatischen Retikulum ablaufen, und der Zusammensetzung der Fettsäuren in den Phospholipoiden der Mikrosomenfraktion zu finden.

In isolierten Lebermikrosomen von Kaninchen wurden der Gehalt an Cytochrom P-450, Protein und Gesamtlipiden und die Fettsäurezusammensetzung einiger Phospholipide, sowie die Änderungen dieser Werte durch 19-tägige Behandlung der Tiere mit Phenobarbital untersucht.

Der Gehalt der Mikrosomen an Lipiden nahm durch die Behandlung in stärkerem Ausmaß (+ 173%) zu als der an Cytochrom P-450 (+ 120%) und wesentlich stärker als der Gehalt an Protein (+ 72%).

Am Ende der Behandlung wurden folgende Änderungen im Fettsäuremuster einiger Phospholipide gefunden: Der Gehalt an Linolsäure (18:2) nahm in der Phosphatidylcholin-Fraktion um 39% und in der Fraktion, welche Phosphatidylinosit und Phosphatidylserin enthielt, um 69% zu.

Darüberhinaus wurden noch folgende Änderungen beobachtet: Abnahme des Gehalts an Palmitinsäure (16:0) in Phosphatidylinosit und Phosphatidylserin um 43% und Abnahme des Gehalts an Stearinsäure (18:0) um 17% in Phosphatidyläthanolamin. Diese Änderungen konnten aber nicht mit genügender Wahrscheinlichkeit statistisch gesichert werden ($p < 0,10$).

Keine der Änderungen in der Zusammensetzung der Fettsäuren ließ sich zu den früher beobachteten qualitativen Änderungen optischer und kinetischer Daten von mikrosomalen Enzymen in direkte Beziehung setzen.

Die beschriebenen Veränderungen könnten jedoch andere Eigenschaften der mikrosomalen Membranen beeinflussen. Die möglichen Änderungen von Membraneigenschaften wurden den an anderen Membranen beobachteten Veränderungen gegenübergestellt und diskutiert.

- ANDERS, M.W., : Kinetics of the inhibition of
MANNERING, G.J., the N-demethylation of ethylmorphine
by 2-diethylaminoethyl-2,2-diphenyl-
valerate-HCl (SKF 525-A).
Molec. Pharmacol. 2, 319 (1966).
- ASSMANN, J. : Änderungen der Zusammensetzung mikro-
somalier Phospholipide aus Kaninchen-
leber-Mikrosomen nach Vorbehandlung
der Tiere mit Phenobarbital, Chlor-
phenothan und 3,4-Benzpyren.
Inaugural-Dissertation, München (1971).
- BENEDETTI, E.L., : in "Ultrastructure in biological
EMMELOT, P., systems". Vol. 4, The Membranes, p. 33,
Dalton, A.J., and Haguenau, F., Ed.,
New York, N.Y., Academic (1968).
- BOYER, P.D., : The combination of fatty acids and related
BALLOU, G.A., compounds with serum albumin.
LUCK, J.M., J. biol. Chem. 167, 407 (1947).
- BRODIE, B.B., : Comparative biochemistry of drug
MAICKEL, R.P. metabolism.
in: Proc. First Int. Pharmacol. Meeting,
Vol. 6, ed. by B.B. Brodie and E.G. Erdös,
p. 299. Oxford-London-New York-Paris:
Pergamon Press 1962.
- CONNEY, A.H. : Pharmacological implications of micro-
somal enzyme induction.
Pharmacol. Rev. 19, 317 (1967).

- CONNEY, A.H., : Specificity in the regulation of the 6 β -,~~7 α~~ -
LEVIN, W., and 16 α -hydroxylation of testosterone by
JACOBSON, M., rat liver microsomes.
KUNTZMAN, R. In: Microsomes and drug oxidations, ed. by
J.R. Gillette, A.H. Conney, G.J. Cosmides,
R.W. Estabrook, J.R. Fouts and G.J. Mannering
New York - London: Academic Press (1969).
- COTMAN, C., : Lipid composition of synaptic plasma mem-
BLANK, M.L., branes isolated from rat brain by zonal
MOEHL, A., centrifugation.
SNYDER, F. Biochemistry 8, 4606 (1969).
- DI AUGUSTINE, R.P., : The effects of unsaturated fatty acids on
FOUTS, J.R. hepatic microsomal drug metabolism and
cytochrome P-450.
Biochem. J. 115, 547 (1969).
- DUTTERA, S.M., : Studies on the phospholipid requirement
BYRNE, W.L., of Glucose-6-phosphatase.
GANOZA, M.C. J. biol. Chem. 243, 2216 (1968).
- EBERHAGEN, D. : Mikroverfahren zur Gewinnung der Fett-
säuremethylester aus komplexen Lipoiden.
Zschr. f. analyt. Chem. 212, 230 (1965).
- EBERHAGEN, D., : Zur Beeinflussung des Lipidstoffwechsels
PLETTE, G., in der Nebenniere der Ratte.
HAUCK, O. Zschr. f. d. ges. exp. Med. 145, 171 (1968).
- ELLINGSON, J.S., : The control of fatty acid composition in
HILL, E., glycerolipids of the endoplasmic re-
LANDS, W.E.M. ticulum.
Biochim. Biophys. Acta 196, 176 (1970).

- FINKELSTEIN, A., :Permeability and electrical properties
CASS, A. of thin lipid membranes.
J. gen. Physiol. 52, 145 s (1968).
- FLEISCHER, S., :Studies of the electron transfer system.
BRIERLY, G., J. biol. Chem. 237, 3264 (1962).
KLOUWEN, H.,
SLAUTTERBACK, D.B.
- FOLCH, J., :A simple method for the isolation and
LEES, M., purification of total lipides from animal
SLOANE-STANLEY, G.H. tissues.
J. biol. Chem. 226, 497 (1957).
- FOSTER, D.W., :Microsomes, microsomal phospholipids, and
McWHORTER, W.P. fatty acid synthesis.
J. biol. Chem. 244, 260 (1969).
- GILLETTE, J. R. :Biochemistry of drug oxidation and re-
duction by enzymes in hepatic endoplasmic
reticulum.
Advanc. Pharmacol. 4, 219 (1966).
- GRAM, T.E., :Effect of pretreatment of rabbits with
ROGERS, L.A., phenobarbital or 3-methylcholanthrene on
FOUTS, J.R. the distribution of drug-metabolizing
enzyme activity in subfractions of hepatic
microsomes.
J. Pharmacol. exp. Ther. 157, 435 (1967a).
- GRAM, T.E., :Further studies on the metabolism of drugs
ROGERS, L.A., by subfractions of hepatic microsomes.
FOUTS, J.R. J. Pharmacol. exp. Ther. 155, 479 (1967b).

- GUARINO, A.M., : Changes in Michaelis and spectral constants
GRAM, T.E., for aniline in hepatic microsomes from
GIGON, P.L., phenobarbital-treated rats.
GREENE, F.E., Molec. Pharmacol. 5, 131 (1969).
GILLETTE, J. R.
- HLAVICA, P., : Die Wirkung von Kohlenmonoxid auf die
KIESE, M., N-Hydroxylierung von Anilin durch Ka-
LANGE, G., ninchenlebermikrosomen.
MOR, G. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac. exp.
Path. 263, 269 (1969).
- HLAVICA, P., : N-oxygenation of N-alkyl- and N,N-dial-
KIESE, M., kylanilines by rabbit liver microsomes.
Biochem. Pharmacol. 18, 1501 (1969).
- JONES, P.D., : A requirement for phospholipids by the
WAKIL, S.J., microsomal reduced diphosphopyridine
nucleotide-cytochrome C reductase.
J. biol. Chem. 242, 5267 (1967).
- JURTSHUK, P. Jr., : Studies on the electron transfer system.
SEKUZU, I., J. biol. Chem. 238, 3595 (1963).
GREEN, D.E.
- KEENAN, T.W., : Phospholipid class and fatty acid composition
MORRÉ, D.J., of Golgi apparatus isolated from rat liver
and comparison with other cell fractions.
Biochem. 9, 19 (1970).
- KIESE, M., : Relationship of drug metabolism to methemo-
globin formation.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 123, 141 (1965).
- KORN, E.D., : Current concepts of membrane structure
and function.
Fed. Proc. 28, 6 (1969).

- KRATZ, F., : Zur Frage der Induzierbarkeit mikrosomaler
STAUDINGER, H.-J. Enzyme am Beispiel der Cumarinhydroxylierung
in der Kaninchenleber.
Hoppe-Seylers Z. phys. Chem. 348, 568 (1967).
- KRÖBER, F., : Qualitative Änderungen in Lebermikrosomen
LANGE, G., Phenobarbital-behandelter Kaninchen.
MATHES, S., Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 267,
MOR, G. 307 (1970).
- KUNTZMAN, R., : Michaelis constants for the hydroxylation of steroid
LAWRENCE, D., hormones and drugs by rat liver microsomes.
CONNAY, A.H. Molec. Pharmacol. 1, 163 (1965).
- LANGE, G. : Über einige Eigenschaften der durch Chlor -
phenothan oder Phenobarbital induzierten
Mikrosomenenzyme aus Kaninchenleber.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp.
Path. 255, 35 (1966).
- LANGE, G. : Verschiedene Induktionen der mikrosomalen N-
und p-Hydroxylierung von Anilin und N-Äthyl-
anilin bei Kaninchen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp.
Path. 257, 230 (1967).
- LANGE, G. : Hydroxylase-Aktivität und Hämoprotein-Gehalt
von Mikrosomen aus Kaninchenleber.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp.
Path. 259, 221 (1968).
- LANGE, G., : Änderung der Zusammensetzung mikrosomaler Lipide
STEBUL, C. durch Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp.
Path. 264, 266 (1969).
- LANGE, G., : Hydroxylierung von Progesteron durch
THUN, K.J. Lebermikrosomen von Kaninchen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp.
Path. 267, 265 (1970).

- LIEN, E.J., :Correlation of ratios of drug metabolism
HANSCH, C. by microsomal subfractions with partition
coefficients.
J. Pharm. Sci. 57, 1027 (1968).
- LUMPER, L., :Zur Wirkung von Lysolecithin und
SCHNELLBACHER, E., (ω -Acyloxyalkyl)-cholin-phosphaten auf die
STAUDINGER, H.-J. Aktivität mikrosomaler Enzyme.
Hoppe-Seylers Z. phys. Chem. 351, 459 (1970).
- MALSY-MINK, P. :Zusammensetzung der Fettsäuren einiger
Phospholipoide aus isolierten Lebermikro-
somen von Kaninchen.
Inaugural-Dissertation, München (in Vor-
bereitung).
- MANZOLI, F.A., :The fatty acids of myelin phospholipids.
STEFONI, S., Febs Letters 10, 317 (1970).
MANZOLI-GUIDOTTI, L.,
BARBIERI, M.
- McMAHON, R.E., :The microsomal oxygenation of ethyl benzene:
SULLIVAN, H.R., isotopic, stereochemical and induction
CRAIG, J.C., studies.
PEREIRA, W.E., Jr. Arch. Biochem. 132, 575 (1969).
- NETTER, K.-J. :Die oxydative N-Demethylierung von N-Mono-
methyl-p-Nitranilin.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac. exp.
Path. 255, 151 (1966).
- NISHIBAYASHI, H., :The binding of the ethyl isocyanide by
OMURA, T., hepatic microsomal hemoprotein.
SATO, R. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 118, 651 (1966).
- O'BRIEN, J.S. :Stability of the myelin membrane.
Science, 147, 1099 (1965).

- OMURA, T., :The carbon monoxide - binding pigment of
SATO, R. liver microsomes. Solubilization, purification and properties.
J. biol. Chem. 239, 2379 (1964).
- PANDE, S.V., :Long chain fatty acid activation in
MEAD, J.F. subcellular preparations from rat liver.
J. biol. Chem. 243, 352 (1968).
- REMMER, H., :Enzyminduktion und Vermehrung von Endo-
MERKER, H.J. plasmatischem Retikulum in der Leberzelle
während der Behandlung mit Phenobarbital.
Klin. Wschr. 41, 276 (1963).
- ROGERS, C.G. :Fatty acids of liver mitochondrial and
microsomal lipids in the rat exposed
to phenothiazine derivatives.
Biochem. Pharmacol. 20, 2518 (1971).
- ROTHFIELD, L., :The role of cell envelope phospholipid
PEARLMAN, M. in the enzymatic synthesis of bacterial
lipopolysaccharide.
J. biol. Chem. 241, 1386 (1966).
- SCHULZE, H.U., :Änderungen im Gehalt der Phospholipide von
STAUDINGER, H.-J. Lebermikrosomen unterschiedlich vorbehandelter
Ratten und Meerschweinchen.
Hoppe-Seylers Z. phys. Chem. 351, 184 (1970).
- SHER, S.P. :Drug enzyme induction and drug interactions:
Literature tabulation.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 18, 780 (1971).
- SIEKEVITZ, P. :in G.E.W. Westenholme and C.M. O'Connor
(Editors) Ciba Foundation symposium on the
regulation of cell metabolism.
Little, Brown, and Company, Boston, 1959.

- SKIPSKI, V.P., : Quantitative analysis of phospholipids by
PETERSON, R.F., thin-layer chromatography.
BARCLAY, M. Biochem. J. 90, 374 (1964).
- SLADEK, N.E., : Evidence for a new P-450 hemoprotein in
MANNERING, G.J. hepatic microsomes from 3-methylcholan-
threne-treated rats.
Biochem. biophys. Res. Commun. 24, 668 (1966).
- SOLOMON, H.M., : The displacement of Phenylbutazone -¹⁴C
SCHROGIE, J.J., and Warfarin-¹⁴C from human albumin by
WILLIAMS, D. various drugs and fatty acids.
Biochem. Pharmacol. 17, 143 (1968).
- STEUBL, C. : Änderungen der Zusammensetzung von Lipiden
in glatten und rauhen Mikrosomenmembranen
durch Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital.
Inaugural-Dissertation, München (in Vorbereitung).
- SZARKOWSKA, S.L., : On the role of ubiquinone in mitochondria.
KLINGENBERG, M. Biochem. Z. 338, 674 (1963).
- TANAKA, R., : Role of phospholipid in the activation of
STRICKLAND, K.P. Na⁺, K⁺ - activated adenosine triphosphatase
of beef brain.
Arch. Biochem. Biophys. 111, 583 (1965).
- THEISE, H., : Die Lipidzusammensetzung der Mikrosomen-
BIELKA, H. fraktion von Leber und Hepatom.
Arch. Geschwulstforsch. 32, 1/2, 11 (1968).
- VEERKAMP, J.H., : Comparative studies on the phosphatides of
MULDER, J., normal rat liver and primary hepatoma.
VAN DEENEN, L.L.M. Zschr. Krebsforschung 64, 137 (1961).

- WEISER, M.M. :The reassociation of lipopolysaccharide,
ROTHFIELD, L. phospholipid, and transferase enzymes of
the bacterial cell envelope.
J. biol. Chem. 243, 1320 (1968).
- ZIEGLER, D.M. :Properties of a mixed function amine oxidase
isolated from pork liver microsomes.
Vortrag auf dem "International Symposium
on Microsomes and Drug Oxidations",
Tübingen, Germany, 1969.

LEBENS LAUF

Wolfgang Maxhofer

- 12.10.45: Geboren als Sohn des stud. rer. agr.
Alois Maxhofer und seiner Frau Erentrudis,
geb. Laimer, in Salzburg
- 20.07.65: Reifeprüfung am Reuchlin-Gymnasium
Ingolstadt
- 20.10.65: Immatrikulation an der Ludwig-Maximilians-
Universität München
Fach: Humanmedizin
- 03.08.71: Ärztliche Prüfung an der Universität München
- 06.08.71: Heirat mit Ulrike Rihl
- 01.09.71: Beginn der Medizinalassistentenzeit
am Städt. Krankenhaus Ingolstadt
- 31.08.72: Approbation als Arzt
- 02.10.72: Einberufung zur Bundeswehr

